

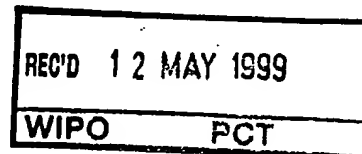
PCT/EP 99/01860
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 99 / 1860



Bescheinigung

09/646740

Die Plantamed Arzneimittel GmbH in Neumarkt, Oberpf./Deutschland hat eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verwendung von Extrakten aus Cimicifuga racemosa und
Belamcanda sinensis als estrogenartiges organselektives
Arzneimittel ohne uterotrope Wirkung"

am 19. März 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
A 61 K 35/78 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 19. April 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 12 204.7

Ebert

BEST AVAILABLE COPY



Verwendung von Extrakten aus Cimicifuga racemosa und Belamcanda sinensis als estrogenartiges organselektives Arzneimittel ohne uterotrope Wirkung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Extrakten aus Cimicifuga racemosa als estrogenartiges organselektives Arzneimittel gemäß Anspruch 1 sowie die Verwendung von Extrakten aus Belamcanda sinensis als estrogenartiges organselektives Arzneimittel gemäß Anspruch 2.

Sowohl von Extrakten aus Cimicifuga racemosa als auch aus Belamcanda sinensis ist aus der Volksmedizin bekannt, daß sie peri- und postmenopausale Beschwerden lindern können.

Dies wurde bislang darauf zurückgeführt, daß die Extrakte beider pflanzlicher Drogen estrogenartige Wirkung mit allen deren nachteiligen Wirkungen auf eine Vielzahl von Organen des menschlichen Körpers, insbesondere Vaginalschleimhaut, Uterus, Ovarien, Knochen, Gefäße, Mineral- und Fettstoffwechsel usw. aufweisen.

Nachteilig hieran ist es jedoch, daß bislang kein Arzneimittel aus diesen Pflanzendrogen im Stand der Technik zur Verfügung stand, welches zu einer organselektiven Prophylaxe oder Therapie verwendet werden kann.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein pflanzliches Arzneimittel mit estrogenartiger Wirkung zur Verfügung zu stellen, das eine organselektive Wirkung aufweist.

Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Merkmale des Anspruch 1 bezüglich der Verwendung von Extrakten aus Cimicifuga racemosa.

Die obige Aufgabe wird ferner durch die Merkmale des Anspruchs 2 bezüglich Belamcanda sinensis.

Bei in vitro- und in vivo- Versuchen hat sich überraschend herausgestellt, daß die Extrakte (sowohl CO₂- als auch Lösungsmittlextrakte) aus Cimicifuga racemosa

und/oder *Belamcanda sinensis* organspezifisch auf sowohl auf das Knochensystem als auch auf das Gefäßsystem wirken, wobei eine uterotrope Wirkung im wesentlichen fehlt.

Daher sind die erfindungsgemäß verwendeten Extrakte zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose, geeignet.

Die Untersuchungen für die Wirksamkeit in diesem Indikationsspektrum wurde an dem bekannten Atherosklerose-Modell von Elger et al. 1995 durchgeführt (Elger, W., Schwarz, S., Siemann, H.-J., Reddersen, G., Schneider, B. [1995] Exp. Clin. Endocr. Diabetes 103:93 V 58)

Sie sind ferner zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Osteoporose, geeignet.

Die Untersuchungen für die Wirksamkeit in diesem Indikationsspektrum wurde an dem bekannten Osteoporose-Modell von Fujimoto et al. (1983) und Uebelhart et al. (1990) durchgeführt (Fujimoto, D. Suzuki, M., Uchiyama A., Miyamoto S. Inoue T. [1983] J. Biochem. 94, 1133-1136; Uebelhart D., Gineyts E., Chapuy M.-C., P.D. [1990] Bone and Material 8, 87-96)

Bevorzugt werden Rhizome, Stengel, Blätter und Blütenblätter der Pflanzen zur Herstellung der Extrakte verwendet.

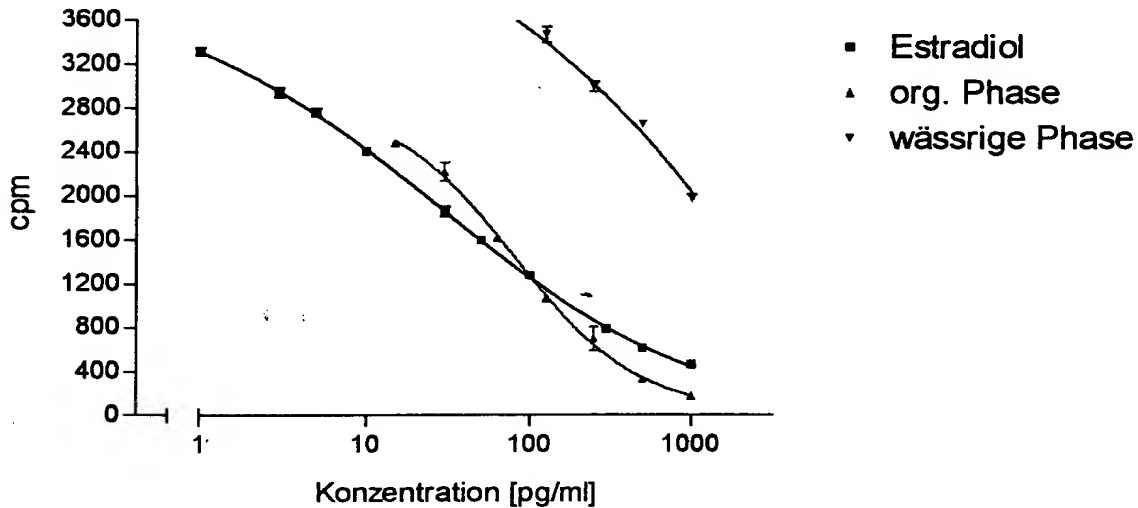
Mit den erfindungsgemäßen Arzneimitteln stehen erstmals Mittel aus *Cimicifuga racemosa* und *Belamcanda sinensis* zur Verfügung, welche als volle Estrogenrezeptor-Agonisten in Knochen und dem kardiovaskulären System fungieren.

Experimenteller Nachweis der estrogenen Wirkung von *Cimicifuga racemosa* und *Belamcanda sinensis*

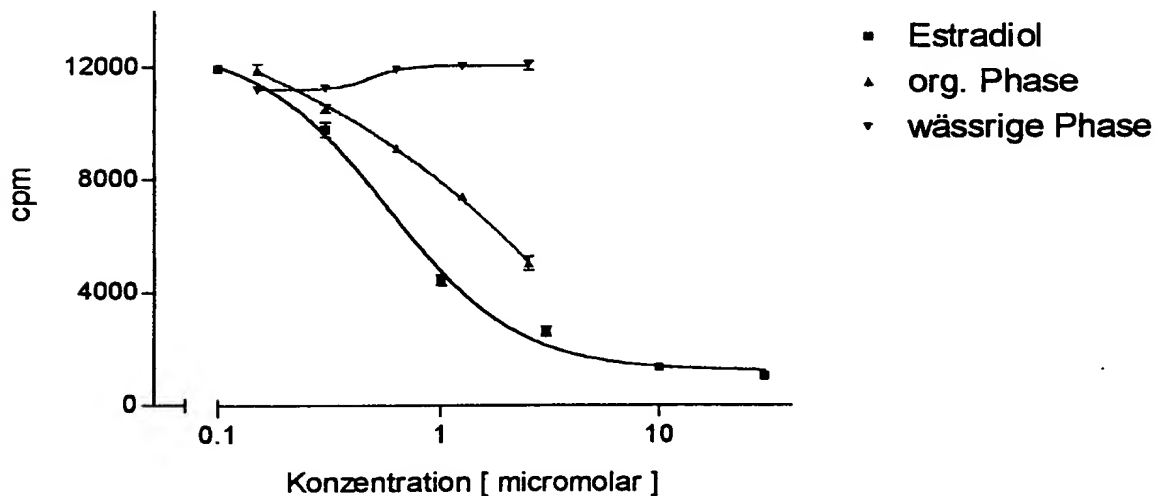
1. Estradiol Radioimmunoassay mit *Cimicifuga racemosa* Extrakt

Vergleich der organischen und wässrigen Phase von CR. Die Konzentration der Ausgangslösungen ist jeweils 17.66 mg/ml. Es folgen Verdünnungen 1:2, 1:4 etc. bis 1:64:

wässrige & organische Phase CR, E2-RIA



wässrige & organische Phase CR, E2-Rezeptor

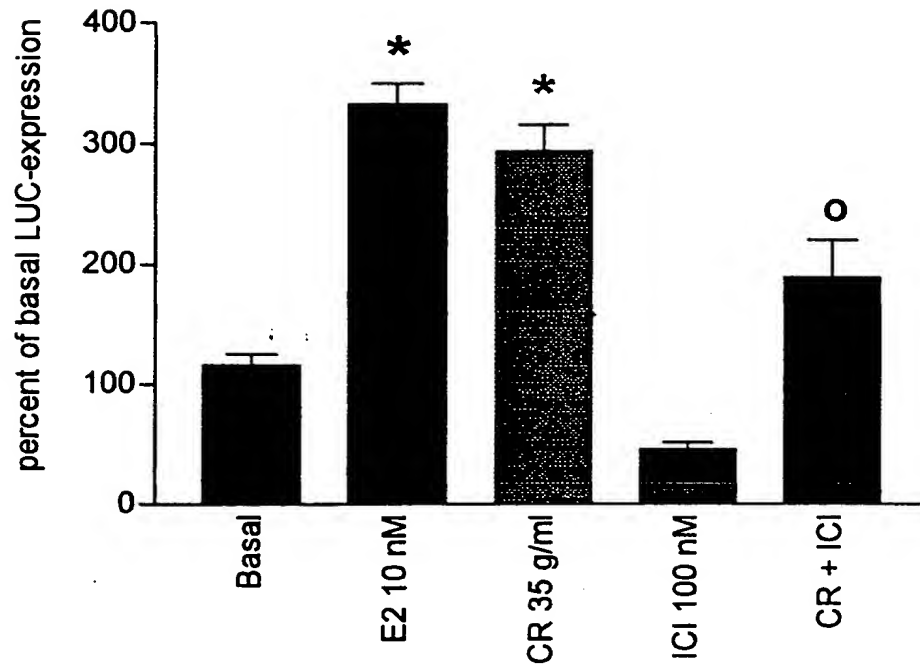


2. Estrogenrezeptor-Assay mit Cimicifuga racemosa Extrakt

Auch mit diesem Test konnte gezeigt werden, daß ein estrogener Effekt vorliegt.

3. Transaktivierender Effekt von Cimicifugaextrakt

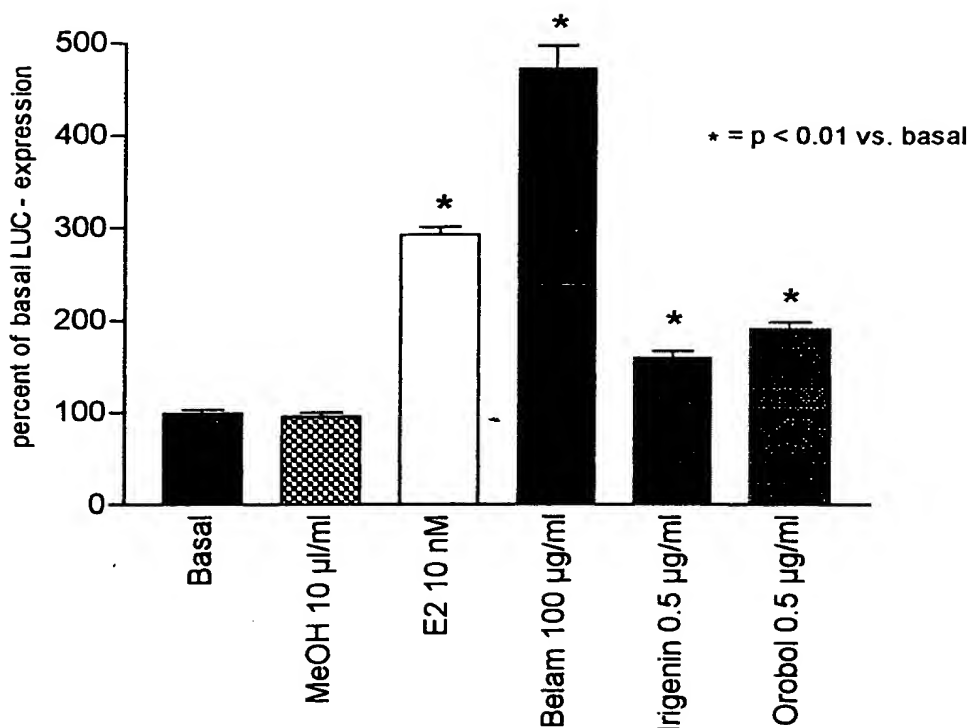
Effect of CR (organic phase 35 µg/ml) on
Luciferase expression in MCF7 cells



3. Reporter-gen-Assay oder Transaktivierende Wirkung

An gentechnisch veränderten Mamma-Ca-Zellen wird eine estradiolrezeptor-vermittelte Aktion durch Cimicifuga-Extrakt in der Zelle beobachtet (=Agonist), die durch den Antagonisten ICI 182780 unterdrückt wird.

M 22.04.99



4. Nachweis einer estrogenen Wirkung an Uterus und Vagina der ovariectomierten Ratte

Die ovariectomierte Ratte gilt als Modell für die postmenopausale Frau, bei der die endogene Estradiol-Produktion zum Erliegen gekommen ist. Durch die externe Zufuhr von Estradiol oder Stoffen die estrogenartig wirken kommt es zu einer Restauration estrogensensibler Parameter wie Zunahme des Uterusgewichtes, dem Auftreten von Schollen-Epithelzellen am Vaginalepithel und einem Absinken des LH-Spiegels.

Es werden weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 240 g. Nach einer Eingewöhnungszeit von 7 Tagen werden die Tiere ovariectomiert.

Die Tiere erhalten frühestens 14 Tage nach der Ovariectomie die jeweilige Prüfsubstanz in der vorgesehenen Konzentration bzw. die Vehikellösung oder Scheinfütterung einmal täglich morgens über einen Zeitraum von 8 Tagen. Entsprechend den zu verabreichenden Prüfsubstanzen und den vorgesehenen Konzentrationen werden 8 Behandlungsgruppen à 12 Tiere (Gruppe 1 - 8) sowie 2 Kontrollgruppen (Gruppe 9 - 10; per os Gabe von CMC vs. unbehandelte Ratten) à 9 Tiere gebildet.

Die Tötung erfolgt an Tag 8, genau 3 Stunden nach der letztmaligen oralen Applikation.

Prüfsubstanzen :

VEH	Vehikel für die orale Applikation	p.o.	CMC	
CE	Cimicifuga-Trockenextrakt 96217	p.o.	CMC	1500 mg/kg KG
DC-O	Dichlormethanextrakt von CE,	p.o.	CMC	184,5 mg/kg KG
DC-IP	Dichlormethanextrakt von CE,	i.p.	Migliol	184,5 mg/kg KG

Referenzsubstanz: 17 β -Estradiol-Valerat: Firma Sigma-Chemie, D-82039 Deisenhofen, Bestell-Nr. 1631.

Zur Herstellung der Suspensionen sowie als Kontroll-Lösung wurde 0,5 %ige Lösung CMC (High Viscosity 1500 - 3000, Firma Sigma-Chemie, D-82039 Deisenhofen,) verwendet.

Messparameter :

Bestimmung des Körpergewichts.

Uterusgewicht, Feuchtgewicht,

Vaginalabstrich,

LH und PRL-Doppelbestimmung mittels RIA,

Radioimmunoassay für die Messung der Hormone Prolaktin und LH

Radioimmunoassay für die Messung Estradiol-Immunreaktivität im Serum

Die Trockenextrakt-Dosis war um das zehnfache der höchsten Dosis des ersten Versuches gesteigert worden. Es wurde der

Trockenextrakt (per os) und die äquivalente Menge von aus diesem Trockenextrakt hergestellten Chloroformextrakt gegeben.

Um den Einfluss der Magen-Darm-Leberpassage abzuschätzen, wurde der Chloroformextrakt einmal per os in einem Dickungsmittel und einmal i.p. in dem synthetischen Triglycerid Miglyol gegeben

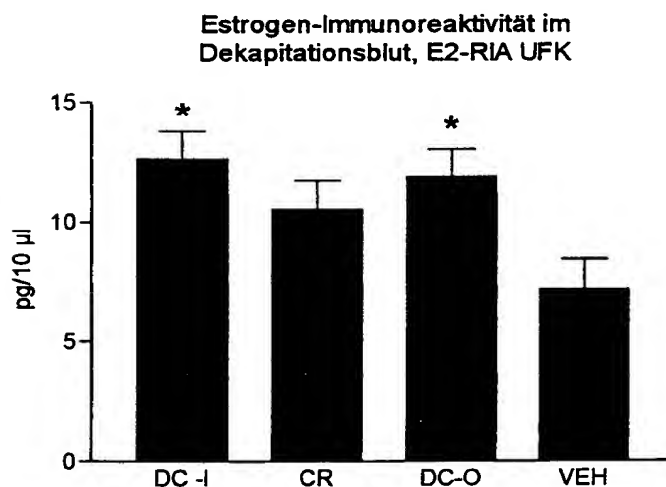
Aus praktischen Gründen wurde keine Dosisanpassung an das Gewicht vorgenommen und allen Tieren die gleiche Dosis, verteilt auf zwei Gaben, appliziert. Die tatsächliche applizierte Dosis auf das Körpergewicht bezogen, lag etwas über 1600 mg/kg.

LH-Spiegel am Tag 4 in ng/ml

Uterusgewichte

Nur nach intraperitonealer Gabe kommt es zu einem schwachen Anstieg des Uterusgewichtes und zu einem Absinken des LH an Tag 4 und (schwächer) an Tag 8.

Die estrogenere Wirkung von Cimicifuga auf den Uterus ist nur schwach ausgeprägt.



Die Proben liegen gut in der STD-Kurve. * = $p < 0.05$ vs. VEH, ANOVA, Dunnett's multiple range Test.

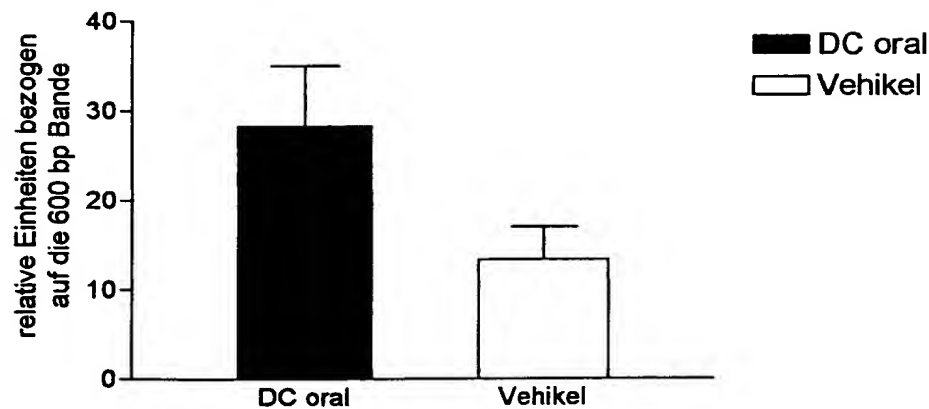
D.h. Bei ovariectomierten Ratten, die selbst nur noch sehr wenig Estradiol produzieren - in der Vehikelgruppe noch etwa 7 pg/10µl Blut - werden signifikant

erhöhte Spiegel von estrogen-immunreaktiven Substanzen erkannt, die aus Cimicifuga stammen und im Blut der Tiere verfügbar sind.

11.22.04.99

DC -I	CR	DC-O	VEH
14.6	7.1	6.0	3.4
12.3	9.4	6.7	5.0
12.2		8.2	4.8
4.8	14.6	14.1	4.8
13.2	6.2	12.6	7.7
21.5	13.9	11.5	3.1
	6.5	12.9	9.0
13.4	10.1	14.1	8.3
10.4	6.5	10.7	8.7
10.6	10.3	15.4	16.8
12.3	12.8	20.4	
13.5	18.3	9.8	

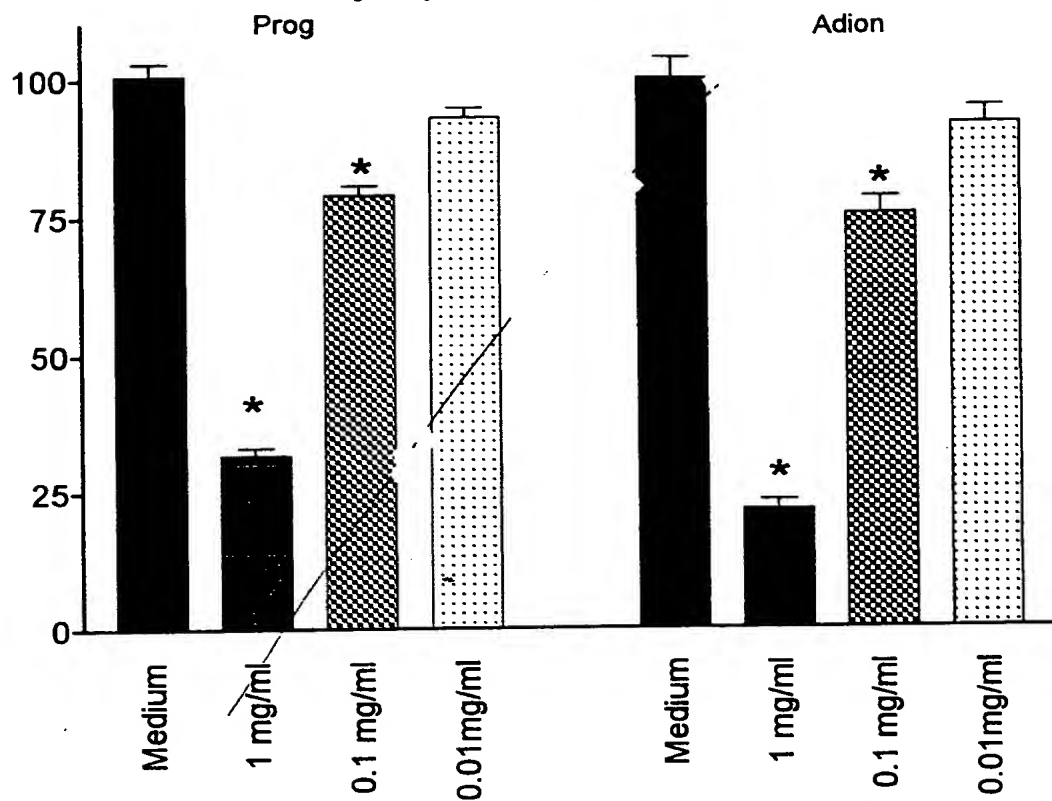
E2-Rezeptorexpression in der POA, n = 5
(signifikant wenn einseitige Tests verwendet werden)

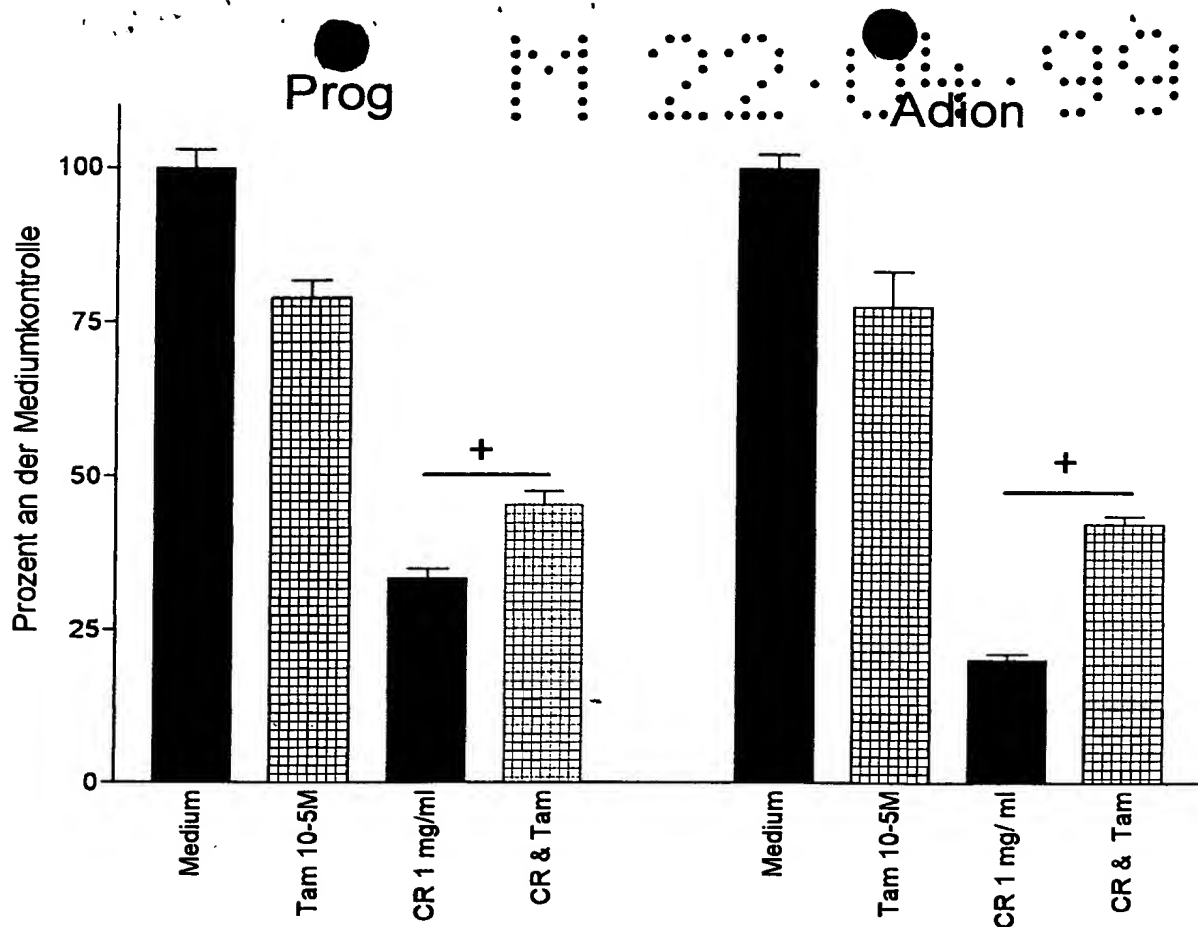


~~5. Hemmung der Freisetzung von Progesteron aus Granulosa-zellen durch CR~~

M 22.04.99

Prozent an der Mediumkontrolle





6. In humanen Granulosazellen inhibiert Estradiol die Freisetzung von Progesteron und Androstendion. Den gleichen Effekt kann man mit Cimicifuga Extrakt auslösen, d.h. es liegt eine eindeutige estrogenartige Wirkung vor. Dies wird weiter erhärtet durch die Tatsache, dass der Estradiolrezeptoragonist Tamoxifen, mit dem die Bindungsstelle für Estrogen besetzt wird, ohne dass es zu einer Wirkung in der Zelle kommt, die Wirkung von Cimicifuga-Extrakt auf die Progesteronfreisetzung abschwächt. Das bedeutet, dass der Effekt von Cimicifuga-Extrakt nicht unspezifisch ist, sondern spezifisch über den Estrogenrezeptor vermittelt wird.

Sämtliche oben aufgeführten Untersuchungen wurden auch mit Extrakten von *Belamcanda sinensis* durchgeführt und zeigten im wesentlichen dieselben Ergebnisse.

Estrogene Aktivität von *Cimicifuga racemosa* und *Belamcanda sinensis*

11.22.04.99

1. E2 RIA (Radio-Immuno-Assay)

ein gegen Estradiol gerichteter Antikörper erkennt Moleküle, die eine partielle strukturelle Ähnlichkeit mit Estradiol haben.

2. Rezeptor-Bindungsassay

Die Ähnlichkeit der bindenden Substanz mit Estradiol muss so groß sein, dass eine selektive (kompetitive) Interaktion mit dem Estradiolrezeptor in einer zellfreien Präparation stattfinden kann. Die Bindung an den Rezeptor ist sehr selektiv; es kann aber nicht ausgesagt werden, ob die nachgeschalteten Prozesse in der Zelle gefördert oder gehemmt werden (Agonist oder Antagonist)

3. Reporter-gen-Assay oder Transaktivierung

An gentechnisch veränderten Mamma-Ca-Zellen wird eine estradiolrezeptor-vermittelte Aktion durch Cimicifuga-Extrakt in der Zelle gemessen (=Agonist)

(Lipophile) Inhaltsstoffe von Cimicifuga racemosa und Belamcanda sinensis geben in allen drei Systemen eine positive Antwort. Bei 2 und 3 allerdings erst in nach einer starken Anreicherung.

4. Am ovariectomierten Ganztier werden keine oder nur sehr schwache estrogenen Wirkungen auf Uterus und Vagina gemessen.

Die Wirkung auf die Hypophyse (LH-Absenkung) wird nur in sehr hohen Konzentrationen deutlich.

5. Aus Bindungsstudien an ZNS -Rezeptoren ergeben sich Hinweise auf eine mögliche zentralnervöse Wirkung.

6. In humanen Granulosazellen inhibiert Estradiol die Freisetzung von Progesteron. Den gleichen Effekt kann man mit Cimicifuga Extrakt auslösen, d.h. es liegt ein eindeutiger estrogenen Wirkung vor. Dies wird weiter erhärtet durch die Tatsache, dass ein Estradiolrezeptoragonist, mit dem die Bindungsstelle für Estrogen besetzt wird, ohne dass es zu einer Wirkung in der Zelle kommt, die Wirkung von Cimicifuga - Extrakt auf die Progesteronfreisetzung unterdrückt. Das bedeutet, dass der Effekt

von Cimicifuga-Extrakt nicht unspezifisch ist, sondern spezifisch über den Estrogenrezeptor vermittelt wird.

Zusammenfassend ist somit belegt, daß Cimicifuga racemosa - Extrakte und Belamcanda sinensis - Extrakte eine estrogene Wirkung besitzen, sie wirken aber organselektiv und wirken nicht am Uterus.

Ferner wurde bezüglich Cimicifuga racemosa folgendes festgestellt:

Die günstigen Effekte von Cimicifuga racemosa bei der Behandlung von klimakterischen Beschwerden sind klinisch gut dokumentiert. Bei Ratten wurden jedoch unterschiedliche Ergebnisse publiziert: Cimicifuga racemosa weist keine uterotrope Wirkung auf, Andererseits inhibiert es Hypophysen-LH bei ovariectomierten (ovx) Ratten. Daher wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt: 1. Die Fähigkeit von Cimicifuga racemosa bzw. dessen angereicherte Fraktionen an den Estrogenrezeptor zu binden, wurde untersucht. 2. Die Transaktivierung eines Reportergenes wurde in MCF7-Zellen getestet. 3. Pulsatile LH-Sekretion in ovx-Ratten oder Estradiol (E)-behandelten Ratten wurde gemessen. 4. Ovx-Ratten wurden mit Cimicifuga racemosa-Extrakt zweimal täglich über 8 Tage mit einer Dosis von ca. 16670 mg/kg, BW oral, behandelt. Serum LH und die Estrogenrezeptor-Genexpression wurde im Uterus und in der medio-präoptischen Region (POA) des Hypothalamus unter Verwendung einer semiquantitativen RT-PCR-Technik gemessen.

Ad. 1: Cimicifuga racemosa enthielt verschiedene Fraktionen, die an den Estrogenrezeptor binden.

Ad. 2: Sowohl Cimicifuga racemosa als auch gut gereinigte Fraktionen bewirkten eine erhöhte Luciferasegenexpression in den Estrogenantwort-Element/Luciferasegen-transfizierten MCF7-Zellen. Ad. 3: Nach einer akuten Injektion von Cimicifuga racemosa ist die pulsatile hypophysäre LH-Freisetzung signifikant vermindert ($P < 0,05$), jedoch traten die Wirkungen von Cimicifuga racemosa nicht so schnell auf in Vergleich mit Estradiol (1 µg/kg BW).

Ad.4: Zweimalige tägliche orale Gabe von hatte keinen Einfluß auf das Gewicht der Uteri, wogegen die Behandlung mit Estradiol die Uterusgewichte signifikant erhöhte ($P < 0,01$). Die Genexpression des Estrogenrezeptors wurde durch Estradiol und

Cimicifuga racemosa- Fraktion, insbesondere lipophile Fraktion, signifikant in der POA des Hypothalamus stimuliert.

Diese Ergebnisse lassen schließen, daß Cimicifuga racemosa an den Estrogenrezeptor binden und Transaktivierung bewirken. Diese Wirkung wird nicht im Uterus ausgeführt, jedoch im Gehirn, wo sie eine Suppression der LH-Freisetzung verursacht.



Ansprüche

- 5 1. Verwendung von Extrakten aus Cimicifuga racemosa als
 estrogenartiges organspezifisches Arzneimittel ohne oder
 wenigstens mit zu vernachlässigender uterotroper
 Wirkung.
- 10 2. Verwendung von Extrakten aus Belamcanda sinensis als
 Estrogen-artiges organspezifisches Arzneimittel ohne oder
 wenigstens mit zu vernachlässigender uterotroper
 Wirkung uterotroper Wirkung.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
 gekennzeichnet, daß der Extrakt zur Herstellung eines fertig
 formulierten Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von
20 kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose,
 dient.
- 25 4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
 gekennzeichnet, daß der Extrakt zur Herstellung eines fertig
 formulierten Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe der
 Osteoporose, dient.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)